

研究結果報告書

2019年4月26日

<研究課題>

AMPK 活性化単糖による脳神経保護の研究

超高齢化社会における脳血管障害・頭部外傷の軽減と予防に向けた動物実験とその応用展開

[代表研究者]

久留米大学 医学部 生理学 脳神経機能部門 本務・脳神経外科兼務 講師

鹿児島大学 医歯学総合研究科 システム血栓制御学講座 客員講師

菊池 清志

[共同研究者]

鹿児島大学 医歯学総合研究科 システム血栓制御学講座 特任教授

丸山 征郎

久留米大学 医学部 生理学 脳神経機能部門 教授

田中 永一郎

久留米大学 医学部 脳神経外科 主任教授

森岡 基浩

鹿児島大学 医学部 保健学科 基礎理学療法学講座 客員研究員

大塚 章太郎

【まとめ】

複数の動物モデル(頭部外傷、外傷性クモ膜下出血、SAMP、脳梗塞、脳出血、SHRSP)にて、運動による神経保護効果を確認した。さらに Retrospective study にて、生活強度により職種を分け、健康状態を比較したところ、生活強度の強い職種では神経保護効果が確認された。運動は AMPK を活性化させる。一方、AMPK 活性化作用をもつ本単糖においても、脳梗塞モデル、SHRSP、SAMP に対する投与実験にて神経保護効果が確認された。今後、検証を進め、本単糖内服による臨床試験を目指す。

1. 研究の目的

約2万人の前向き試験において、脳卒中発症前の運動量が多い群は、発症後の転帰が良好であった[1]。この生体内でのメカニズムは AMPK(AMP 活性化プロテインキナーゼ)活性化によるものと考えられる。脳卒中や頭部外傷モデルにおいて、AICAR(AMPK 活性化剤)が神経保護効果を持つが [2]、BBB(血液脳関門)を通過しにくいことで実用化に至っていない。

AMPK は代謝恒常性の重要な調節因子で、その機能異常は糖尿病、肥満、がんなどのさまざまな病気につながりかねない。グルコース飢餓のようなストレスのかかる状況では、AMPK が活性化することが知られている。グルコースが枯渇すると、グルコース代謝の低下による ATP の減少と AMP、ADP の増加が起こるため、カノニカルな AMP/ADP 依存性方式で AMPK が活性化されると考えられてきた [3]。AMPK は Akt と協調して、Sirt1-PGC1

経路を活性化し、ミトコンドリア生成などに寄与する。ミトコンドリアでは、運動により活性化された Sirt3 が加齢に伴う機能障害に対して保護的に作用する可能性がある[4]。

本研究では共同研究者の丸山が開発した AMPK 活性化作用を有する生体内希少糖(国際特許出願中のため名称は非公開。既に農水省から食品添加材として使用が認可されている本単糖の安全性に関しては、農水省ブランドニッポン、JST などの予算で既に検証済み)を頭部外傷の神経保護薬として開発することを当初の目的としていた。しかしながら、本単糖を作製する際に必要な“酵素を含む植物”が不作で、被験者が長期間服用する十分な量を準備できなかった。そのため、当初の研究目的を少々変更し、同じく AMPK を活性化させる“運動”の効果を検証することとした(なお、一部のヒト試験と動物モデルでは、本単糖を準備することができたため、検証した)。

加齢に伴い身体機能が低下し、日常生活能力が低下する。日本の人口動態において介護を必要とする人が加速度的に増加することが、高齢社会の進展に伴い予測されている。近年「健康寿命」という概念が提唱され、普及してきたことでも分かるように、元気で活動的に暮らすことができる期間をいかに延ばすかが大きな政策的課題となっている。適度な身体活動・運動、精神活動、社会参加が高齢者の様々な身体機能の低下を軽減する効果を有することは定説になってきている。本研究では、様々な職種を運動強度別に分類し、健康との関係を後ろ向きに検証(retrospective study)した。

さらに SAMP(老化促進モデルマウス)・頭部

外傷モデル・外傷性クモ膜下出血モデル・脳梗塞(自家動脈血栓)モデル・脳出血モデル、SHRSP(脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)などにおいて、“preconditioning (発症前の運動)” や “本単糖” の効果を検証した。

2. 研究方法と経過

2-1 本単糖が代謝に与える影響の検証

健康成人男性(2名)に対して、75g 経口糖負荷試験 (OGTT) における本単糖 (糖負荷前に1度だけ経口摂取) の効果をインスリン抵抗性 (HOMA-R)、インスリン分泌能評価 (insulinogenic index)、インスリンの分泌能 (HOMA-β) にて評価した。

2-2 本単糖が血栓に与える影響の検証

健康成人男性(2名)にて、本単糖 (1度だけ経口摂取) の T-TAS® (血栓形成能解析システム: 藤森工業株式会社) における抗血栓効果を評価した。

2-3 職種と健康との関係の検証

【対象者】

- (1)年齢: 70 歳以上の者
- (2)頭部 MRI 撮影 および 長谷川式スケール (HDS-R) を同年に施行された者

【被験者除外基準】

- (1)頭部 MRI 画像データと HDS-R を同年に施行されていない者
- (2)本研究に同意を得られなかった者

過去の記録より、頭部 MRI 画像、HDS-R、脳卒中の既往歴、内服歴を比較する。

2-4 頭部外傷モデル(fluid-percussion injury)モデルマウスにおける予防運動の効果について

雄性 C57BL/6 J の 4 週齢を使用して無作為に 10 匹ずつ運動群と非運動群(Control)に分けた。予防運動群は、トレッドミル強制運動装置 (MK-680, MUROMACHI KIKAI CO. LTD, Japan) を使用して、20m/min の速度で 8 週間、週 5 日、1 日 30 分の予防運動を行った。Control 群は、8 週間ケージ内で自由飼育を行った。予防運動介入終了後にドラゴンフライを用いて頭部外傷作製を行った。

頭部外傷作製後に、麻酔を解除し、正向反射が起こるまでの時間を評価した。頭部外傷作成後 48 時間で屠殺を行い、屠殺前に、神経行動学的評価、運動-感覚機能の評価、協調運動機能を行った。神経行動学的評価は、

Neurological Severity Score(NSS)を用いて行った。運動-感覚機能の評価は、Otsuka らによるテープテスト [5]を用いて実施し、協調運動機能は Rota-Rod にて落下するまでの時間を評価した。

2-5 外傷性クモ膜下出血モデルラットにおける予防運動の効果について

SD ラット 40 匹 (365.2±28.4 g) を使用して無作為に 20 匹ずつ予防運動群と非運動群(Control)に分けた。予防運動群は、トレッドミル強制運動装置 (MK-680, MUROMACHI KIKAI CO. LTD, Japan) を使用して、25m/min の速度で 3 週間、週 5 日、1 日 30 分の予防運動を行った。Control 群は、3 週間ケージ内で自由飼育を行った。予防運動介入終了後にクモ膜下出血の作製を行った。

クモ膜下出血作製後に、CT 撮影を行いクモ膜下出血が作成できているかどうかを確認し、運動群、Control 群で同様の出血量があることを評価した。運動群では、20 匹中 15 匹作製でき、Control 群では、20 匹中 18 匹であった。クモ膜下出血作成後 5 時間で屠殺を行い、屠殺前に、神経行動学的評価、運動-感覚機能の評価、覚醒時間の評価を行った。神経行動学的評価は、ガルシアによる神経評価法を用いて行った。運動-感覚機能の評価は、Otsuka らによるテープテスト [5] を用いて実施し、覚醒時間の評価は、SAH 作成後から正向反射が起こるまでの時間を計測し、独自のスケールで評価を行った。

2-6 SAMP における予防運動 および 生体内希少単糖の効果について

雄性 SAMP8(老化促進モデルマウス)を使用して 3 か月齢より無作為に 12 匹ずつ本単糖配合飼料群と対象飼料群に分けた。両群ともに飼料の摂取は約 4g/日であった。運動の効果については 7 か月齢時から 9 か月齢時まで 10 週間、週 5 回、1 回 15 分の走行運動を実施した。走行運動は、Rota-Rod 強制運動装置を使用した。運動介入は 10 時から 16 時の明期中に行った。運動介入開始前には、両群ともに 1 週間、週 3 回の練習期間を設けた。非運動群は、運動介入を行わず 9 か月間、飼育ケージ内で自由飼育を行った。本単糖配合飼料群、対象飼料群、運動群、非運動群は経時的に Open Field を用いて、最大速度、移動距離、静止時間、高速移動時間、低速移動時間、静止時間を含まない平均速度の行動学的評価を SMART ビデオ画像行動解析装置 (SMART-BS, バイオリサーチセ

ンター、愛知)にて解析した。評価は動物実験施設の明期中(10時~16時)に行った。運動介入終了後24時間で屠殺を行い、屠殺前に、協調運動機能評価を行った。協調運動機能はRota-Rodにて落下するまでの時間を評価した。

2-7 脳梗塞(自家動脈血栓)モデルにおける予防運動および生体内希少単糖の効果について

臨床病態に近い自己血血栓を用いたラット脳塞栓モデルを用いた。対照群、予防的運動群、本単糖の予防的投与群(モデル作製前3日間の腹腔内投与)、治療的投与群(モデル作製直後に腹腔内投与)、治療的投与群+AMPK阻害剤(Compound C)の併用群の5群に分け、神経機能および梗塞領域を比較した。

2-8 脳出血モデルにおける予防運動の効果について

C57/BL6マウス20匹を使用して無作為に予防運動群と非運動群に分けた。運動群は、トレッドミル強制運動装置(MK-680, MUROMACHI KIKAI CO. LTD, Japan)を使用して20m/minの速度で8週間、1日30分のモデル作成前予防運動を行った。非運動群は8週間ケージ内で自由飼育を行った。予防運動介入終了後に、両群ともにコラゲナーゼ誘発線条体出血モデル(ICH)を作製した。頭蓋骨にドリルで穿頭孔をあけ、定位座標(正中線から横方向2.3mm, プレグマ前方0.2mm, 頭蓋骨下3.5mm)に30G針を挿入した。1 μ lのコラゲナーゼVII(Siguma) 0.15U in DWを0.2 μ l/minの速さで注射した。注射後10分間、針を留置したのち、慎重に針を抜き、頭皮を縫合した。運動群は10匹中8匹、非運動群は10匹中7匹作製に成功した。ICH作成48時間後に神経行動学的評価(mNSS)、運動-感覚機能評価(テープテスト)、バランス評価(ビームウォーキングテスト)、協調運動機能評価(ローターロッドテスト)を行った後速やかに屠殺し、脳を採取したのち、組織学的評価用に処理した。

2-9 SHRSPにおける予防運動および生体内希少単糖の効果について

SHRSP(脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)雄性7週令(SLE社)を12匹の実験動物を使用した。本単糖投与群6匹、Control群6匹を無作為に群分けした。SHRSPには、本単糖を混ぜた特殊飼料(オリエンタル酵母製)を通常の餌と置き換え、さらに、脳血管障害を発症しやすくするために、0.9%の生理食塩水を与え塩分負荷を行った。特殊飼料は、一日25g

摂取するように与えた。特殊飼料を与えた翌週から毎日体重測定を実施し、ラットの状態観察を行った。さらに、本単糖の効果を確認するために、神経行動学的評価も実施した。運動感覚機能を評価するSticky-tape test、持久力とバランス機能を評価するRotaRodtest、バランス機能を評価するBeam walking testを行った。また、毎週1回ラット・マウス血圧測定器(室町機器・MK-2000)を使用して血圧を測定した。8週令から上記の評価を行い、11週令まで機能評価や血圧測定を行った後に、屠殺を行い、組織を採取した。

3. 研究の成果

3-1 本単糖が代謝に与える影響の検証

HOMA-R, insulinogenic index, HOMA- β のいずれにおいても、本単糖のインスリン抵抗性改善効果が確認された。

3-2 本単糖が血栓に与える影響の検証

運動前に本単糖を摂取することで、運動単独の時より、抗血栓効果が増強された。

2-3 職種と健康との関係の検証

現在、解析を進めているが、生活強度の強い職種では神経保護効果が確認された(論文化前のため、詳細な記載は控えます。ご容赦ください)。

3-4 頭部外傷モデル(fluid-percussion injury)マウスにおける予防運動の効果について

頭部外傷作製後、非運動群で正向反射までの時間が平均15:34であったのに対し、運動群では5:45と有意に覚醒までの時間が短かった。神経行動学的評価は両群に有意差は見られなかった。テープテストは、Control群に比べて運動群で左右の上肢で反応時間が短縮しており、運動-感覚機能障害が軽減していた。Rota-Rod耐久性テストでは、非運動群で落下までの時間が平均48.94秒であったのに対し、運動群では105.29秒と有意に協調運動機能障害が軽減されていた。

3-5 外傷性クモ膜下出血モデルラットにおける予防運動の効果について

SAH作製後5時間で、運動群で15匹中11匹が生存し、Control群では、18匹中9匹が生存した。神経行動学的評価は、Control群に比べて運動群で有意に高く、障害が軽減していた。テープテストは、Control群に比べて運動群で左右の上肢で有意に反応時間が短縮して

おり、運動・感覚機能障害が軽減していた。

3-6 SAMP における予防運動 および 生体内希少単糖の効果について

6 か月齢現在、本単糖配合飼料群と対象飼料群で行動学的評価に有意な差はみられていないが本単糖配合飼料群は対象飼料群に対して最大速度で高値を示している。また、Rota-Rod 耐久性テストでも同様に本単糖配合飼料群が対象飼料群に対して、協調運動機能が低い傾向にある。今後 9 か月齢まで観察していく。機能的に有意差がでた場合、機序解明のために免疫染色 および ウェスタンブロッティングにて、検証を進めていく。

運動群については行動学的評価で非運動群と比較して最大速度、移動距離、高速移動時間の項目で有意に高い結果となり、静止時間においては有意に低い結果となった。協調運動機能は非運動群で介入前と比較し、有意な低下を認めた。しかし、運動群では介入前と比較し同等の協調運動機能を有していた。

3-7 脳梗塞(自家動脈血栓)モデルにおける予防運動および 生体内希少単糖の効果について

ラット脳塞栓モデルにて、予防的運動群、本単糖の予防的投与群、治療的投与群は、対照群に比べ、神経機能の有意な改善 および 脳梗塞領域の有意な縮小を認めた。一方、治療的投与群+AMPK 阻害剤の併用群は、治療的投与群に比べ、神経機能の有意な増悪 および 脳梗塞領域の有意な増大を認めた

なお、実験の一部は、これまでに共同研究者の大塚によって、論文化を済ませている[5, 6]

3-8 脳出血モデルにおける予防運動の効果について

mNSS、テープテスト、ビームウォーキングテストにおいて、非運動群と比較して、運動群で有意に機能が残存した(mNSS : $P < 0.01$, テープテスト : $P=0.29$, ビームウォーキングテスト : $P=0.04$, ローターロッドテスト : $P = 0.08$)。また、非運動群と比較して運動群で、線条体出血範囲が有意に低下した($P = 0.01$)。

ローターロッドテストは、術前評価において、運動群の落下時間がはやく(運動群 : 121 ± 13.8 秒, 非運動群 : 273.4 ± 5.5 秒,)、長期間の運動がマウスの興奮性を高め、ローターロッドに長時間乗っていられなくなると考えられた。ICH 作成から 48 時間後の評価では、運動群、非運動群ともに同じくらいの時間乗っていた為(運動群 : 54.0 ± 5.5 秒, 非運動群 : 76

± 18.7 秒, $P = 0.55$)、術前の落下時間で正規化すると運動群で落下時間が低下しづらい傾向が見られたが、有意差はなかった($P = 0.08$)。

3-9 SHRSP における予防運動および 生体内希少単糖の効果について

体重は、本単糖投与群では、 247.5 ± 12.1 g、Control 群は 258.3 ± 9.83 g であり、Control 群の方が体重増加傾向であったが、有意差は見られなかった。Sticky-tape test は、左右両上肢に $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ のテープを貼り、剥がす、までの時間を測定した。8 週令から開始したが、11 週令においても機能低下は見られず、11 週令では、本単糖群 (右上肢 4.93 ± 5.02 秒、左上肢 4.05 ± 1.76 秒) と Control 群 (右上肢 3.48 ± 1.56 、左上肢 3.71 ± 1.79) で有意な差は見られなかった。Rotarod は、Mode5 (4.0-40rpm、300 秒) の設定で 3 回測定した平均値を出した。8 週令から 11 週令にかけて徐々に機能低下がみられており、11 週令では、本単糖群で 51.3 ± 51.1 秒、Control 群では、 22.4 ± 17.2 秒と Control 群に比べて本単糖群で機能維持が図れていたが、有意差は見られなかった。Beam walking test は、棒上歩行を行い、スコアをつけていく機能評価で、0-5 の 6 段階評価である。0 : が棒から落下する。5 : 失敗なく渡り切れる。点数が上がるにつれて機能が高くなるというスコアである。8 週令から徐々に機能低下がみられたが、本単糖群に関しては大きな機能低下はなく、11 週令では、Control 群に比べて本単糖群で有意に機能の改善がみられていた ($P < 0.05$) 血圧測定に関しても、8 週令から 11 週令にかけて徐々に血圧上昇がみられたが、Control 群に比べて本単糖群で有意な血圧の低下がみられていた。

4. 今後の課題

臨床試験の結果を前向きに検証するためにスポーツ科学が専門のグループと共同研究を行い、データ収集中である。

動物実験に関しては、機能的に有意差があることを確認できている実験に関しては、免疫染色 および ウェスタンブロッティングなどにて検証を進め、詳細な機序を解明する。

一方、現時点で、機能改善傾向は期待できるものの、有意差を確認できていないものに関しては、再現性確認のため、今後、“n”を増やして、改めて検討する。機能的に有意差がでた場合には、免疫染色 および ウェスタンブロッティングなどにて検証を進め、機序を解明する。

さらに本単糖投与群の実験を施行していな

いものに関しては、今年度中に実施する。

5. 研究成果の公表方法

上述したとおり、本単糖の十分な量を準備できず、申請時の研究計画を一部変更した。しかしながら、本研究は、複数の論文の publish を目指し、現在も進行中である。

6. 参考文献

[1] Rist PM et al., Physical activity, but not body mass index, predicts less disability before and after stroke. *Neurology*. 2017 May 2;88(18):1718-1726.

[2] Marangos PJ et al., Adenosinergic modulation of homocysteine-induced seizures in mice. *Epilepsia*. 1990 May-Jun;31(3):239-46.

[3] Kemp BE et al., Metabolism: Energy sensing through a sugar diphosphate. *Nature*. 2017 Aug 3;548(7665):36-37.

[4] Yasuharu Matsumoto et al., Molecular mechanisms of cardiac rehabilitation for better prognosis.

J Jpn Coron Assoc. 2015; 21: 53-57

[5] Otsuka S et al., Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 γ after focal brain ischemia in rats. *Brain Struct Funct*. 26; 1-12, 2018

[6] Otsuka S et al., The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats.

Behav Brain Res. 15;303:9-18, 2016

以上